

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-276935

(43)Date of publication of application : 26.10.1993

(51)Int.Cl.

C12N 1/20
C12P 13/08
//(C12N 1/20
C12R 1:15)
(C12N 1/20
C12R 1:13)
(C12P 13/08
C12R 1:15)
(C12P 13/08
C12R 1:13)

(21)Application number : 04-278305

(71)Applicant : DEGUSSA AG

(22)Date of filing : 16.10.1992

(72)Inventor : KIRCHER MANFRED DR
GUENTHER KURT DR
BACHMANN BERND DR

(30)Priority

Priority number : 91 4134450 Priority date : 18.10.1991 Priority country : DE

(54) METHOD FOR INCREASING EFFICIENCY OF AMINO ACID EXCRETING STRAIN OF
CORYNEFORM BACTERIA AND PRODUCTION OF AMINO ACID BY FERMENTATION

(57)Abstract:

PURPOSE: To increase the excretion efficiency of amino acids, especially L-lysine from an amino acid-excretion strain of coryneform bacteria by inducing the proliferation performance of the strain on trehalose and selecting the strain in a trehalose-containing medium.

CONSTITUTION: The proliferation performance of an amino acid-excretion strain of coryneform bacteria [e.g. *Corynebacterium glutamicum* (ATCC13032)] is induced e.g. by the mutagenesis of the strain with N-methyl-N'-nitro-N- nitrosoguanidine and the strain having induced proliferation performance on trehalose is selected by using a trehalose-containing medium. The selection is preferably carried out by alternately repeating the inoculation of the cultured cell to a trehalose-containing medium and a saccharose-containing medium until the proliferation speed of the cultured cell in trehalose becomes equal to the proliferation speed in saccharose.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 29.07.1999

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-276935

(43)公開日 平成5年(1993)10月26日

(51)IntCl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 1/20	A	7236-4B		
C 1 2 P 13/08	A	8931-4B		
// (C 1 2 N 1/20				
C 1 2 R 1:15)				
(C 1 2 N 1/20				

審査請求 未請求 請求項の数7(全 5 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平4-278305

(22)出願日 平成4年(1992)10月16日

(31)優先権主張番号 P 4 1 3 4 4 5 0 . 2

(32)優先日 1991年10月18日

(33)優先権主張国 ドイツ (DE)

(71)出願人 590002378

デグッサ アクチェンゲゼルシャフト

ドイツ連邦共和国 フランクフルト アム

マイン ワイスフラウエンストラッセ

9

(72)発明者 マンフレート キルヒャー

ドイツ連邦共和国 ビーレフェルト 1

リートシュテュック 16 アー

(72)発明者 クルト ギュンター

ドイツ連邦共和国 エアレンゼー ランゲ

ンゼルボールダー ヴェーク 45

(74)代理人 弁理士 矢野 敏雄 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 コリネ型細菌のアミノ酸排出性菌株の効率を増大させる方法及びアミノ酸の発酵的製造方法

(57)【要約】

【目的】 コリネ型細菌のアミノ酸排出性菌株の効率を増大させる方法。

【構成】 該菌株においてトレハロース上での増殖能力を誘発しかつ誘発変異体をトレハロース含有培地で選択する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 コリネ型細菌のアミノ酸排出性菌株の効率を増大させる方法において、該菌株においてトレハロース上で増殖するための能力を誘発しかつトレハロース含有培地によって選択を行うことを特徴とする、前記方法。

【請求項2】 トレハロース含有培地及びサッカロース含有培地によって交互に選択を行う、請求項1記載の方法。

【請求項3】 コリネバクテリウム属を使用する、請求項1又は2記載の方法。

【請求項4】 プレバクテリウム属を使用する、請求項1又は2記載の方法。

【請求項5】 L-リシン排出性菌株を使用する、請求項1から請求項4までのいずれか1項記載の方法。

【請求項6】 改良すべき菌株がトレハロースを排出する、請求項5記載の方法。

【請求項7】 請求項1記載の細菌菌株を使用することを特徴とするアミノ酸の発酵的製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、アミノ酸、特にL-リシンを排出するコリネ型細菌の効率を増大させる方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 必須アミノ酸であるL-リシンは食品及び動物飼料添加物として及び薬剤学的製品の作用物質及び成分として工業的に極めて重要である。L-リシンの製造のためには発酵が重要な方法である。就中コリネバクテリウム属及びプレバクテリウム属のコリネ型細菌が該製造において使用される。これらの菌株のリシン合成の調節は、該菌株がリシンを自己の必要量以上に生産して培地中に排出するように、突然変異によって変化されている。このような過剰生産菌は、アミノ酸物質代謝の個々の段階が阻害されている変異体（例えばHse又はトレオニン栄養要求体）、又はリシンの類似物質に対しては抵抗性があるか又は他の変異も有している変異体の探索によって得られる。高効率菌株は一般に、1種以上の栄養要求性、1種以上の類似物質抵抗性又はこれらの変異の組合せを有している。リシン生産菌の開発の総括的記載はO. Tosaka及びK. Takinamiによってなされている（*Progr. Ind. Microbiol. (Biotechnol. Amino Acids)* 24, 1986, 152~172）。

【0003】 さて、菌株の効率は全物質代謝の炭素の流れがリシンの方向にできるだけ効率的に強制されることによって決まる。これは一つにはリシン合成の活性化及びこの範囲におけるネックの除去を意味し、二つには副生成物の形成をもたらす物質代謝経路の阻害を意味する。すなわちK. Nakayamaは、リシン生産菌に

関してホモセリン、バリン、グルタミン酸、乳酸塩及びコハク酸塩の生成を記載している（*The Microbial Production of Amino Acids*; K. Yamada, S. Kinoshita, T. Tsunoda, K. Aida編; John Wiley & Sons, 1972, 369~398）。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の課題は、他の突然変異によってアミノ酸、特にリシン排出性コリネ型細菌の効率を高めることである。

【0005】

【課題を解決するための手段】 前記課題は、冒頭記載の方法において、コリネ型細菌のアミノ酸、特にL-リシン排出性菌株においてトレハロース上での増殖能力を誘発することを特徴とする方法によって解決される。トレハロースは α -D-グルコピラノシル- α -D-グルコピラノシドである。プレバクテリウム・フラブム（*flavum*）の例において、トレハロースは野生型によって（R. Londoni, Th. Walker; *Bioscience Reports* 5, 509~515, 1985）及びリシン排出変異体によって（L. Inbar, A. Lapidot; *Eur. J. Biochem.* 162, 621~633, 1987）合成されることが証明された。またコリネバクテリウム・グルタミクム（*glutamicum*）のアミノ酸生産性菌株についてもトレハロースの生成が記載された（C. A. 116 (15) 150157j, この場合にはトレハロースを含有するグルタミン酸発酵ブイオンが酵素トレハロースで後処理される。

【0006】 しかし同時に、コリネバクテリウム・グルタミクム（ATCC13032）のようなコリネ型細菌はC源としてのトレハロース上では増殖せず、プレバクテリウム・フラブム（ATCC14067）及びプレバクテリウム・ラクトフェルメンツム（*lactofermentum*）（ATCC13869）は僅かに増殖することも証明することもできる。これら3種の菌株についてはトレハロースからの酸の形成は、全自動同定装置VITEK（AMS/IMS型）又はOF-試験栄養培地（Merk Art. 10987）で検出することはできない。フェノールレッドブイオン（Merck Art. 10987）ではプレバクテリウム・フラブム及びラクトフェルメンツムの場合弱い陽性反応が認められ、コリネバクテリウム・グルタミクムの場合にはトレハロースからの酸形成は検出できない。

【0007】 従来はトレハロースをC源として使用するコリネ型細菌の特性と、アミノ酸を排出する同細菌の能力との間の関係は知られていなかったけれども、今や、トレハロース上での増殖能力が誘発されたコリネ型アミノ酸排出細菌が出発細菌よりも増大されたアミノ酸生産

を示すことが見出された。この事実は、特にもともとトレハロースも排出する菌株の場合にあてはまる。同時に、トレハロースを利用する変異体が培地でトレハロースとは異なるC源上で培養される場合には、野生型とは反対にトレハロースをあまり蓄積しないか又は他の選択の場合にはもはやトレハロースを蓄積しないことが見出された。また初めの選択段階後に分離された変異体がトレハロースを排出しない場合にも、他の選択方法によって収量を出発菌株の収量よりも高めることができる。

【0008】これは、トレハロース中での培養菌の増殖速度がサッカロース中での増殖速度に等しくなるまで、トレハロース含有培地とサッカロース含有培地に培養菌を交互に反復接種する方法である。誘発は、出発菌株を慣用の化学的又は物理的変異誘発要因、例えばMNN G: N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン又は紫外線に暴露することによって行われる。適当なコリネ型細菌、好ましくはコリネバクテリウム属、特にコリネバクテリウム・グルタミクム、又はブレバクテリウム属、特にブレバクテリウム・フラブム又はラクトフェルメンツムに属する細菌の選択は、一般に公知の微生物学的方法によって行われる。

【0009】

【実施例】実施例は、化学的変異誘発要因(MNNG)によって得られた、コリネ型バクテリウム・グルタミクム(ATCC13032)の種々のL-リシン及びトレハロース排出変異体に関する。トレハロースは濃度範囲0.5~100g/l、好ましくは1~10g/lで使用する。

【0010】例1

表1

菌株	L-リシン g/l	トレハロース g/l	トレハロース 上での増殖
DM282-2	34.6	5.5	-
Klon Ia3	36.7	0	+
Klon Ia6	37.2	0	+
DMA45	36.5	0	+
Klon IIIe2	35.4	0	+

例2

例1と同様にしてDM346-1(leu⁻, AEC^r, OXA^r)に変異誘発及び選択を施す。33℃で24時間インキュベートした後、試料を取って、一部分を新しい選択培地に接種する。試料の他の部分をCASO寒天(Merck Art. 5458)で分離する。個々のコロニーの表現型をBMC O培地で遺伝標識、すなわちロ

DM282-2(leu⁻, AEC^r)を一晩中標準I-ブイオン(Merck Art. 7882)中で培養し、生理学的食塩水(0.9%NaCl)で洗浄し、MNN G(N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン)を用いてLD₃₇で変異誘発を行い、液状選択培地に接種する。選択培地は、グルコースを含有せず、トレハロース5g/l及びL-ロイシン100μg/mlを追加したBMCG培地である(BMCG: Liebl et al, Appl. Microbiol. Biotechnol. (1989) 32:205~210)。33℃で24時間インキュベートした後、試料を取り、一部分を新しい選択培地に接種する。試料の他の部分をCASO寒天(Merck Art. 5458)で分離する。個々のコロニーの表現型を、BMCG培地で遺伝標識、つまりロイシン栄養素要求性、AEC耐性及びトレハロース利用性について試験する。この方法を、トレハロースを利用する変異体が検出されるまで24時間ごと反復する。リシン生産を試験するために、トレハロースを利用する変異体をCASOブイオン(Merck Art. 5459)で16時間インキュベートする(250rpm, 33℃)。この懸濁液を、そらせ板を有する100mlフラスコ中の試験培地9mlでグルコース・H₂O88g/lで1:10に希釈し、48時間インキュベートする(33℃, 250rpm)。48時間後に発酵ブイオンを遠心分離し、上澄み液のリシン濃度をアミノ酸分析によって測定し、上澄み液のトレハロース濃度をHPLCによって測定する。

【0011】

イシン栄養素要求性、AEC耐性、オキサリシン耐性及びトレハロース利用性について試験する。トレハロースを利用する変異体が検出できるまで、前記方法を24時間ごとに反復する。リシンの生産及びトレハロースの蓄積の試験は例1と同様にして行う。

【0012】

表2

菌株	L-リシン g/l	トレハロース g/l	トレハロース 上での増殖
DM346-1	36.9	4.9	-
DM548	42.0	0	+
DM559	37.7	0	+

DM591

40.3

0

+

例 3

例 1 及び例 2 で分離した変異体の L-リシン生成と比較してさらに L-リシン生成を相対的に増大させるために、前記変異体をさらに変更方法でトレハロースに対して選択する。DM545 (例 1) を、グルコースの代りにサッカロース 1 g/l を含有しかつ L-ロイシン 100 μ g/ml の追加された BMCG 培地で 33℃ で一晩中培養する。24 時間後に試料を、グルコースの代りにトレハロース 1 g/l を含有しかつ L-ロイシン 100 μ g/l の追加された BMCG 中に 1:100 の割合で移す。並行試験では、糖を含有せずかつ L-ロイシン 100 μ g/ml の追加された BMCG を 1:100 の割合で接種する。二つの培養菌を、トレハロース含有培養菌の 660 nm での光学濃度が糖不含培養菌の光学濃度を越えるまで、33℃ で振盪下にインキュベートする。

次にトレハロース含有培養菌から試料を 1:100 の割合で、グルコースの代りにトレハロース 1 g/l を含有しかつ L-ロイシン 100 μ g/l の追加された BMCG 中に接種する。24 時間後に培養菌を前記のようにしてトレハロース含有培地及びサッカロース含有培地に接種する。トレハロース含有培地とサッカロース含有培地への交接種を、トレハロースにおける増殖速度がサッカロース含有培地での増殖速度に等しくなるまで続ける。この培養菌から菌細胞を分離し、例 1 と同様にして CASO ブイヨンでインキュベートする。この懸濁液を試験培地 9 ml 中でサッカロース 80 g/l で 1:10 に希釈し、例 1 と同様にして 72 時間インキュベートする。発酵ブイヨンの分析を例 1 と同様に行う。

【0013】

表 3

菌株	L-リシン g/l	トレハロース g/l
DM282-2	28.15	4.84
DM545	30.09	0
DM641	31.15	0
S234	30.78	0
S256	31.14	0
S198	31.52	0

例 4

例 3 で記載した実験を反復した、但し選択培地におけるトレハロース及びサッカロースの濃度はそれぞれ 10 g

/l であった。

【0014】

表 4

菌株	L-リシン g/l	トレハロース g/l
DM282-2	28.7	5.2
DM545	30.6	0
DM646	33.17	0
DM647	33.06	0
DM648	33.02	0
DM649	32.68	0
DM653	33.03	0

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 5

識別記号

庁内整理番号

FI

技術表示箇所

C12R 1:13)

(C12P 13/08

C12R 1:15)

(C12P 13/08

C12R 1:13)

• (72)発明者 ベルント バッハマン
ドイツ連邦共和国 ヴェルター マイヤー
フェルト 10 アー